

POWERED BY **Dialog**

**Liposomal medicament containing biphosphonic acid salt, - contained in liposomal shell consisting of cholesterol and specific phospholipid(s), used to inhibit transplant rejection**

**Patent Assignee: MAX PLANCK GES FOERDERUNG WISSENSCHAFTEN**

**Patent Family**

Patent Number	Kind	Date	Application Number	Kind	Date	Week	Type
DE 19637890	A1	19980319	DE 1037890	A	19960917	199817	B

**Priority Applications (Number Kind Date):** DE 1037890 A ( 19960917)

**Patent Details**

Patent	Kind	Language	Page	Main IPC	Filing Notes
DE 19637890	A1		4	A61K-031/66	

**Abstract:**

DE 19637890 A

A liposomal medicament (A) comprises a biphosphonic acid salt (I) as active agent, contained in a liposomal shell consisting of cholesterol (Chol), 1,2-dialkoylglycero-3-phosphocholine and 1,2-dialkoylglycerophosphoglycerol in a ratio of 1-2:2-6:1-3. The alkoyl groups contain 14-22C.

USE - (A) is used to inhibit transplant rejection (method claimed). It is useful in general for inhibiting vascular rejection in allogenic-transplanted organs (e.g. heart, liver or small intestine), and may be effective in 'rescue therapy' for combatting rejection reactions which do not respond to conventional immuno-suppressant therapy.

Dwg.0/0

Derwent World Patents Index

© 2005 Derwent Information Ltd. All rights reserved.

Dialog® File Number 351 Accession Number 11763382



⑬ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 196 37 890 A 1**

⑤① Int. Cl.<sup>6</sup>:  
**A 61 K 31/66**  
A 61 K 9/127  
C 07 F 9/38  
C 07 F 9/09  
// C 07 J 9/00

②① Aktenzeichen: 196 37 890.7  
②② Anmeldetag: 17. 9. 96  
④③ Offenlegungstag: 19. 3. 98

DE 196 37 890 A 1

⑦① Anmelder:  
Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der  
Wissenschaften e.V. Berlin, 80539 München, DE  
  
⑦④ Vertreter:  
H. Weickmann und Kollegen, 81679 München

⑦② Erfinder:  
Erfinder wird später genannt werden

⑤④ Biphosphonat-Liposomen

⑤⑦ Ein liposomales Arzneimittel enthält als Wirkstoff ein Biphosphonsäuresalz in einer Liposomenhülle aus Cholesterin, 1,2-Dialkoylglycero-3-phosphocholin und 1,2-Dialkoylglycerophosphoglycerin im Mengenverhältnis 1 bis 2 : 2 bis 6 : 1 bis 3, wobei die Alkoylgruppen gleich oder verschieden sind und 14 bis 22 Kohlenstoffatome aufweisen.

DE 196 37 890 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 01. 98 802 012/325

4/25

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Arzneimittel mit einem Biphosphonsäuresalz als Wirkstoff, verpackt in Liposomen. Clodronsäure ist Dichlormethylendiphosphonsäure und ist in Form ihrer physiologisch verträglichen Salze als Calciumregulator im Stoffwechsel bekannt. Überraschenderweise wurde nunmehr gefunden, daß Clodronat in Liposomen verpackt die Abstoßung von transplantierten Nieren im Tierexperiment (Ratten) verhindert. Neben Clodronsäure haben aufgrund erster Untersuchungen auch weitere Arzneimittelwirkstoffe aus der Biphosphonsäurederivatgruppe entsprechende Brauchbarkeit.

Gegenstand der Erfindung ist daher ein liposomales Arzneimittel, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß es als Wirkstoff ein Biphosphonsäuresalz im Innern einer Liposomenhülle enthält.

Als Wirkstoff wird Clodronsäure bevorzugt. Andere geeignete Biphosphonsäurederivate, die im Rahmen der Erfindung eingesetzt werden können, sind Etidronat (1-Hydroxyethyliden-biphosphonsäure), Aleudronat (4-Amino-1-hydroxy-butyliden-biphosphonsäure), Pamidronat (3-Amino-1-hydroxy-propyliden-biphosphonsäure), BM 21.0955 (1-Hydroxy-3(methylpentylamino)propyliden-biphosphonsäure).

Bevorzugt wird erfindungsgemäß ein derartiges Arzneimittel, dessen Liposomenhülle aus Cholesterin, 1,2-Dialkoylglycero-3-phosphocholin und 1,2-Dialkoylglycerophosphoglycerin, wobei die Alkoylgruppen gleich oder verschieden sind und 14 bis 22 C-Atome enthalten, im Molverhältnis 1 : 1 bis 2,5 : 0,5 bis 1 besteht. Besonders bevorzugt wird als Phosphocholinbestandteil das 1,2-Dipalmitoylglycero-3-phosphocholin und als Phosphoglycerinbestandteil das 1,2-Dipalmitoylglycerophosphoglycerin.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels zur Verhinderung der Abstoßung von Implantaten, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man ein physiologisch verträgliches Biphosphonsäuresalz in einer Liposomenhülle verpackt. Als Biphosphonsäuresalz wird, wie oben schon erwähnt, Clodronsäuresalz bevorzugt. Ebenfalls geeignet sind die anderen erwähnten Biphosphonsäuresalze sowie strukturanaloge Verbindungen.

Die Herstellung erfolgt so, daß die Liposomenhülle einen Durchmesser von unter 200 nm aufweist. Bevorzugt wird dabei unter solchen Bedingungen gearbeitet, daß man Liposomen mit einem mittleren Durchmesser unter 100 nm erhält. Das Liposom ist bevorzugt aus Cholesterin, 1,2-Dialkoylglycero-3-phosphocholin und 1,2-Dialkoylglycerophosphoglycerin zusammengesetzt und zwar im Molverhältnis von vorzugsweise 1 : 1 bis 2,5 : 0,5 bis 1. Die Alkoylgruppen in den genannten Bestandteilen können gleich oder verschieden sein und enthalten vorzugsweise 14 bis 22 C-Atome.

Die Herstellung des erfindungsgemäßen Arzneimittels kann nach dem Fachmann bekannten Methoden ausgehend von einem physiologisch verträglichen Biphosphonat und den Bestandteilen der Liposomenhülle erfolgen. Zweckmäßig werden die Lipide, aus denen die Liposomen zusammengesetzt sind, in einem geeigneten organischen Lösungsmittel gelöst und die Lösung des Lipidgemisches zur Trockene gebracht und anschließend in einer wäßrigen Clodronatlösung dispergiert und schließlich durch Hochdruckhomogenisation in Liposomen überführt. Der nicht-eingeschlossene Wirkstoff wird durch ein geeignetes Verfahren (z. B. Cross-Flow-Filtration) abgetrennt.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Verhinderung der Abstoßung von Transplantaten, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man mindestens ein Biphosphonsäuresalz in Liposomen verpackt verabreicht. Die Verabreichung erfolgt durch Injektion, vorzugsweise intravenös.

Die Versuche zur Wirkung von intravenös verabreichtem Clodronat am allogenen Nierentransplantat der Ratte haben eine fast vollständige Verhinderung der Abstoßung in Nierengefäßen und eine Besserung der Abstoßung im Gewebe ergeben. Es ist somit zu erwarten, daß Clodronat generell in allogenen-transplantierten Organen (z. B. Herz, Leber, Dünndarm) eine vaskuläre Abstoßung inhibieren kann. Clodronat könnte als "rescue therapy" in mit konventionellen Immunsuppressiva nicht behebbaren Gefäß-Abstoßungsprozessen beim Menschen eingesetzt werden. Die Verhinderung der Abstoßung wird nach dem erhaltenen histologischen Bild auf eine vaskuläre Elimination von Monozyten zurückgeführt.

Das folgende Beispiel erläutert die Herstellung der erfindungsgemäßen Clodronatliposomen.

## Beispiel

## Herstellung der Clodronat-Liposomen

## Material

1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin, synthetisch (DPPC)  
1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerin, synthetisch (DPPA)  
Cholesterin (Chol)  
Clodronsäure-di-Natrium 4H<sub>2</sub>O p.o. (Clo)  
Saccharose.

## Herstellung der 200 mM Clodronat-Lösung

14,44 g Clodronat werden in knapp 200 ml Wasser gelöst, mit Natriumcarbonat (etwa 4 g) auf den pH Wert eingestellt und auf das genaue Endvolumen von 200 ml gebracht unter Bildung einer 200 mM Clodronat-Lösung mit einem pH-Wert von 7,2.

## Herstellung von 200 ml Liposomen

Die Einwaage wird so gewählt, daß die Lipidkonzentration bezogen auf das Volumen der Saccharose-Lösung 100 mM beträgt. Die molare Zusammensetzung der Lipidkomponenten Chol/DPPC/DPPG beträgt 3 : 5:2

1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DPPC)	7,34 g
1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (DPPA)	298 g
Cholesterin (Chol)	2,32 g.

Zur Herstellung der Liposomen werden die Lipide in einem Gemisch aus Chloroform/Methanol unter Rotation bei einer Wasserbadtemperatur von +35°C bis maximal +40°C gelöst. Die Lipidkonzentration ist 200 mM. Anschließend wird das Lösungsmittel vollständig unter Vakuum entfernt ( $T \leq 40^\circ\text{C}$ , 240 RPM) und bei Raumtemperatur unter Vakuum 2 Stunden getrocknet ( $P \leq 15\text{ mbar}$ ).

Die Lipide werden in der Clodronat-Lösung (200 mM, pH 7,2) vordispersiert. Die Lipidkonzentration ist 100 mM. Der Lipidansatz wird unter Rotation 1 Stunde bei einer Wasserbadtemperatur von +50°C getempert. Die resultierende Suspension sieht milchig aus und sollte keine Klumpen enthalten. Ohne Rotation bildet sich ein Bodensatz, der vor dem Umfüllen aufzuschütteln ist.

Anschließend wird eine Hochdruckhomogenisation durchgeführt. Die vorgetemperte Lipidsuspension wird auf +30°C bis +40°C abgekühlt, eingefüllt und die Homogenisierung im Umlauf gestartet. Während der Homogenisierung wird der Lipidansatz gerührt. 10 Durchläufe bei 900 bis 1000 bar sind ausreichend. Nach der Homogenisierung ist der Lipidansatz weniger milchig und hat einen leicht bläulichen Schimmer.

Zur Abtrennung von evtl. auftretendem Abrieb (bedingt durch die Hochdruckhomogenisation) eignet sich eine Kühlzentrifuge mit entsprechenden Rotoren. Die Zentrifugation wird bei 5°C durchgeführt und dauert 30 Minuten. Anschließend wird der Überstand durch einen Faltenfilter abdekantiert.

Die Abtrennung des nicht in Liposomen eingeschlossenen Clodronates erfolgt bei Raumtemperatur durch eine Diafiltration (Cross-Flow-Filtration). Die Liposomendispersion wird dazu mit dem 15-fachen Volumen einer 5%igen Saccharose-Lösung gewaschen.

Bemerkenswerterweise sind die erfindungsgemäßen Liposomen ohne Qualitätsverlust gefrierfähig.

Die so hergestellte Liposomensuspension weist folgende Merkmale auf:

pH-Wert:  $7,3 \pm 0,5$

mittl. Durchmesser: < 100 nm (num. Wichtung)

liposomaler Wirkstoff: 11  $\mu\text{mol/ml}$

Phospholipid: 42,4  $\mu\text{mol/ml}$  (DPPC + DPPA)

Phospholipidabbau: < 3% (Mol)

Gesamtlipid: 61,2  $\mu\text{mol/ml}$  (DPPC + DPPA + Chol)

Lipidverhältnis: DPPC/DPPA/Chol (4,9/2,0/3,1, Mol/Mol/Mol)

Aussehen: opaleszente Dispersion

Sterilfiltration: möglich

Transport: als Tiefkühlware ( $-80^\circ\text{C}$ ) auf Trockeneis

Lagerung: bei  $-80^\circ\text{C}$

Haltbarkeit: als Tiefkühlware ( $-80^\circ\text{C}$ ) mind. 12 Monate nach Herst., nach Auftauen höchstens 2 Tage bei +4°C bis +10°C.

## Patentansprüche

1. Liposomales Arzneimittel, dadurch gekennzeichnet, daß es als Wirkstoff ein Biphosphonsäuresalz in einer Liposomenhülle aus Cholesterin, 1,2-Dialkoylglycero-3-phosphocholin und 1,2-Dialkoylglycerophosphoglycerin im Mengenverhältnis 1 bis 2 : 2 bis 6 : 1 bis 3 enthält, wobei die Alkoylgruppen gleich oder verschieden und 14 bis 22 Kohlenstoffatome aufweisen.

2. Arzneimittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Liposomenhülle aus Cholesterin, 1,2-Dialkoylglycero-3-phosphocholin und 1,2-Dialkoylglycerophosphoglycerin, wobei die Alkoylgruppen gleich oder verschieden und 14 bis 22 Kohlenstoffatome enthalten, im Mengenverhältnis 1 bis 2 : 2 bis 6 : 1 bis 3 besteht.

3. Arzneimittel nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß es 1,2-Dipalmitoylglycero-3-phosphocholin und 1,2-Dipalmitoylglycerophosphoglycerin enthält.

4. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß es als Biphosphonsäuresalz Clodronat enthält.

5. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß es als Biphosphonsäuresalz mindestens einen Wirkstoff aus der Gruppe 1-Hydroxyethylen-bisphosphonsäure, 4-Amino-1-hydroxy-butyliden-biphosphonsäure, 3-Amino-1-hydroxypropyliden-biphosphonsäure und 1-Hydroxy-3(methylpentylamino)-propyliden-biphosphonsäure enthält.

6. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels zur Verhinderung der Abstoßung von Implantaten, dadurch gekennzeichnet, daß man ein physiologisch verträgliches Biphosphonsäuresalz in einer Liposomenhülle verpackt.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß man unter solchen Bedingungen arbeitet, welche einen mittleren Durchmesser der Liposomen unter 100 nm ergeben.

8. Verfahren zur Verhinderung der Transplantatabstoßung, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Arznei-

mittel nach einem der Ansprüche 1 bis 5 verabreicht.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65